

## Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) 성장호르몬 cDNA의 염기배열 결정

이종영 · 권혁추\* · 김세연 · 박홍양

전국대학교 동물자원연구센터, \*선문대학교 식량자원학부

## Determination of Growth Hormone cDNA in Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*

Jong Young Lee, Hyeuk Choo Kweon\*, Se Yon Kim and Hong Yang Park

Animal Resources Research Center of Kon-Kuk University

\*Faculty of Food Resources, Sun-Moon University

Amplification of brook trout growth hormone cDNA using polymerase chain reaction (PCR) produced a nucleotide of 1,120 bp which contained the 5'non-coding region (13 bp), an open reading frame (ORF) coding a growth hormone polypeptide consisting of 210 amino acids (630 bp), and a 3'non-coding region (477 bp). In open reading frame s signal peptide of 22 amino acid and 2 potential disulfide bond sites deduced by 4 cysteine residues were observed.

Brook trout growth hormone has 97.1%, 94.8%, 94.3%, 91.9%, 66.2%, 63.5%, 62.9%, 62.3%, 53.8% and 48.1% amino acid identity with that of Atlantic salmon, chum salmon, rainbow trout, coho salmon, tuna, tilapia, yellow tail, carp, flounder and eel, respectively.

Key words : Growth hormone, cDNA, PCR, Brook trout, *Salvelinus fontinalis*

### 서 론

어류의 성장호르몬은 22,000 dalton의 single chain polypeptide hormone으로, 뇌하수체전엽(anterior pituitary)의 somatotrophs에서 발현되며, carbohydrate나 lipid mobilization의 자극에 의해 어류의 성장을 촉진시키고(McKeown et al., 1975, Donaldson et al., 1979), 회귀성 어류에서는 해수 적응 능력을 조절하는 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Bolton et al., 1987, Young et al., 1989, Madsen, 1990). 또한, 성장호르몬은 동물의 성장을 촉진하는 somatomedin의 생산을 촉진하여 골·연골 그리고 생체조직·기관의 성장을 촉진하는 기능

을 갖고 있으며, cDNA를 이용한 transgenic fish의 생산이나 *in vitro*에서의 성장호르몬 합성을 통하여 양식어류에 응용 함으로써 어류의 유전적 개량에 이용될 수 있는 유전자이다.

이러한 어류 성장호르몬 cDNA 및 유전자에 관한 연구가 chum salmon *Oncorhynchus keta* (Sekine et al., 1985, 1989), rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Agellon et al., 1986), Atlantic salmon *Salmo salar* (Johansen et al., 1989), chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Song et al., 1992), coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Gonzalez-Villasenor et al., 1988), tuna *Thunnus thynnus* (Sato et al., 1988), tilapia *Tilapia nilotica* (Rentier-

Delrue et al., 1989b), Yellow tail *Seriola quinqueradiata* (Watahiki et al., 1988), eel *Anguilla japonica* (Saito et al., 1988), carp *Cyprinus carpio* (Koren et al., 1989) 그리고 flounder *Paralichthys olivaceus* (Watahiki et al., 1989) 등에서 보고되었다.

Chum salmon (Kawauchi et al., 1986), rainbow trout (Agellon et al., 1988; Ren-tier-Delrue et al., 1989a) 그리고 Atlantic salmon (Johansen et al., 1989)에서 두가지 유형의 성장호르몬 cDNA는 각기 서로 다른 성장호르몬 유전자에서 유래하고 있음이 시사되었고, 이후에, sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* (Devlin et al., 1993) 그리고 chinook salmon (Shao et al., 1993)등에서 서로 다른 성장호르몬 유전자인 GH-I 과 GH-II가 분리되었고, 그 염기서열이 결정되었다. 이와같은 성장호르몬 유전자에 관한 연구를 통하여 연어과에서 GH gene의 중복구조는 25~100만년 전 사배체화에 의해 만들어진 것으로 사료되었고, 모든 연어과 어류의 GH gene은 중복된 이중구조를 갖고 있는것으로 사료되었다(Allendorf and Thorgaard, 1984).

본 연구는 연어과 어류의 성장호르몬 cDNA에 관한 연구가 *Salmo*屬 그리 *Oncorhynchus*屬에 분류되는 어종에서는 그 보고가 있었으나, *Salvelinus*屬에 분류되는 어종에서는 아직 그 보고가 없었다. 따라서 *Salvelinus*屬에 분류되는 brook trout의 뇌하수체로부터 성장호르몬 cDNA를 cloning하여 그 구조를 밝히고, 앞으로, 본 연구에서 cloning한 cDNA를 이용하여 단백질의 대량생산 및 transgenic fish를 생산하는데 이용하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료채취 및 primer의 설계

일본의 수산청양식연구소 日光支所에서 양식되고 있는 brook trout (*Salvelinus namaycush*)을 동경수산대학의 유전생화학연구실에서 조직별로

급속·동결보존 하였고, 본 연구를 위하여 동경수산대학 유전생화학강좌의 협조를 얻어 뇌하수체 조직을 제공받았다. GenBank에 등록된 Atlantic salmon, chum salmon, coho salmon 그리고 rainbow trout의 성장호르몬 cDNA의 염기서열을 참고로 ORF를 포함하여 5'과 3'의 비단백질번역영역을 증폭할 수 있도록 primer를 작성하였고, 녹십자(TAKARA Biotechnology, Japan)에 합성을 의뢰하였다.

### 2. cDNA의 합성

Brook trout의 뇌하수체조직 0.1 g으로부터 QuickPrep Total RNA Extraction Kit (Pharmacia)를 이용하여 total RNA를 추출하였고, oligo(dT)-cellulose spun column을 이용하여 total RNA에 포함되어 있는 mRNA 만을 추출·정제하였다.

추출·정제된 mRNA 약 2 µg과 약 100 ng의 oligo(dT)를 혼합하여 70°C에서 10분간 가열 후, 냉각시켰다. 그리고 이 반응액에 DTT(1µl)와 Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase (AMV-RT)를 첨가하여 41°C에서 1시간 반응시켜, 0.5 µg/µl의 first strand cDNA를 합성하였다(Life Sciences, U.S.A).

### 3. Growth hormone cDNA의 증폭

이미 보고된 Atlantic salmon, chum salmon, coho salmon 그리고 rainbow trout의 성장호르몬 cDNA의 염기서열을 비교하여 합성한 primer 5'(ATTAAGAGTAAAAATGGGAC)과 3'(CAATAAAGCTTCTCTGCGGT)를 각각 1 µM, 그리고 brook trout의 뇌하수체 조직에서 합성된 cDNA 1 µg을 혼합하여 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분간의 반응을 30회 실시한 후, 72°C에서 5분간의 신장반응을 실시하여 brook trout 성장호르몬 cDNA로 예상되는 DNA 단편을 증폭시켰다. 증폭된 DNA 단편은 0.8% agarose gel에 전기영동하여 그 길이를 측정하였고, 제한효소로 절단하여 그 유형을

조사하였다.

4. 염기서열의 결정

PCR에 의해 증폭된 brook trout 성장호르몬 cDNA 단편은 pGEM T-vector (Promega)에 삽입하였고, 이것을 대장균 JM109로 형질전환하여 형성된 colony로 부터 plasmid DNA를 추출하였다(Sambrook et al., 1989).

추출된 plasmid DNA를 형광물질로 primer의 5' 말단을 표식하였고, Sanger의 dideoxy sequencing 방법을 응용한 Automated Sequencer로 sequencing 하였다. 결정된 염기서열은 internet의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 GenBank의 자료와 그 상동성을 조사하였고, GENETYX-MAC computer program (SDC software, Japan)의 UPGMA법으로 성장호르몬 cDNA의 아미노산 배열을 이용하여 계통수를 작성하였다.

결 과

1. PCR 증폭산물의 확인

Brook trout의 뇌하수체 조직으로부터 합성된 cDNA를 주형으로 PCR을 실시한 결과 약 1.2 kb의 PCR 증폭 산물을 확인하였다. 이 산물을 여러 종의 제한효소로 절단하여 그 형태를 확인한 후, T-vector에 삽입된 plasmid DNA를 추출하여 삽입하기 전의 제한효소 유형과 같은 DNA 단편을 확인한 후, 전 염기서열을 결정하였다.

2. Brook trout 성장호르몬 cDNA의 염기서열 분석

PCR에 의해 증폭된 brook trout 성장호르몬 cDNA의 길이는 1,120 bp이고, 이중 14~16 bp에 위치한 ATG 시작 codon에서 544~546 bp에 위치한 TAG 정지 codon 사이의 630 bp로 구성된 210 아미노산 잔기로 이루어진 open reading frame (ORF) 그리고 13 bp의 5' 상류영역과 477 bp의 3' 하류영역으로 이루어져 있음을 확인하였다(Fig. 1).

```

ATTAGAGTAAAAATGGGACAAGTGTTCCTGCTGTTGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTT 60
      M G Q V F L L L P V L L V S C F 16
TCTGAGTCAAGGGGACGGCATGGAAAACCAACGGCTCTTCAACATTGGCGTCAACCGGGT 120
      L S Q G A A M E N Q R L F N I A V N R V 36
GCAACATCTCCACCTAATGGCTCAGAAAATGTTCAATGACTTTGAAGTTACCCGTGTGCC 180
      Q H L H L M A Q K M E N D F E V T L L P 56
TGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCCTGCTGGACTCTGTAACTCCGACTCCAT 240
      D E R R Q L N K I F L L D F C I N S D S I 76
CGTGAGCCCAATCGACAAGCAGGACATCAGAAGGTTCAAGTCTGAGTCTGAGTCTCCACAT 300
      V S P I D K H E T Q K S S V L K L L H I 96
CTCTTACCGTCTGATTGAATCCTGGGAGTACCTAGCCAGACCTTGACCATCTCCAACAG 360
      S Y R L I E S W E Y P S Q T L T I S N S 116
CCTCATGGTCAGAAAACCAACAGATCTCTGAGAAGCTCAGCGACCTCAAAGTGGGCAT 420
      L M V R N S N Q I S E K L S D L K V G I 136
CAACTGCTCATCAGGGGAGCCAGGATGGCTACAAAGCCTGGATGACAAATGACTTCA 480
      N L L I T G S Q D G V Q S L D D D N D S Q 156
GCAGCTGCCCCCTACGGGAACACTACAGAACTGGGGGGGCGACGGAAAGCTCAGGAG 540
      Q L P P Y G N Y Y Q N L G G D G N V R R 176
GAACTACGAGTTGTTGGCTGCTCAAGAGGACATGCACAAGTCTGAGACCTACTGAC 600
      N Y E L L A C F K K B M H K V E T Y L T 196
CGTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGAGGCGAACTGCACCTGTGAGACGTGGGCTGGAGA 660
      V A K C R K S L E A A N C T L 210
GGCAGCCAGCAAGAGCCTGTCTCCAGGGTTCGGTTCCCGATACAGATTAGCCCTTGC 720
CTGCACTGAAGAGCAATTTTCATTGAGATTCCTCTTGAACATGCTTTTATGCTAGAGT 780
AGATTATTTCTATCTAGTAGAGGCTGACTACAGGATTTTCATTTTGTCTGAAAT 840
CAACAACAGCACTTCTATATGAACTCTATTACTGAGACTACCATTTGATTAGACTTT 900
ATGAAAAGGTTATTAATGCTTATTTAGATATGATTCAGGGTGTCTACTGTTTFA 960
TGCATACATTAATATTTAGGGGTGAATGGGAACTTTGAGAGCTCCAAAGCTTTTGGATA 1020
TATATTTTAGAGTAATTTCTTAAAGTATTTTATTCCTTAAATCATATTTGTTGAACATA 1080
ATACTGATTCGTTTTTTTTCAATAAGCTTCTCTGGCT 1120
    
```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) growth hormone cDNA. Putative signal peptide sequences are shown bold and underlined from the first residue to 22 residues. The start codon ATG and stop codon TAG are underlined. The polyadenylation signal AATAAA are underlined and located at 1,102~1,107. The glycosylation signals NDS(at 153~155 aa) and NCT(AT 207~209 aa) are underlined.

Brook trout의 성장호르몬 cDNA는 22 아미노산으로 이루어진 signal peptides가 존재하였고 (Fig. 1), 이는 brook trout를 포함하여, 현재까지 보고된 연어과 어종 (Sekine et al., 1985, 1989; Agellon et al., 1986; Johansen et al., 1989; Song et al., 1992; Gonzalez-Villasenor et al., 1988)과 carp (Koren et al., 1989)가 22 아미노산의 signal peptides로 이루어져 있는 반면에 tilapia (Rentier-Delrue et al., 1989b), flounder (Watahiki et al., 1989) 그리고 tuna (Sato et al., 1988)의 경우는 21 아미노산으로 이루어져 있었다. 그리고 포유동물 (human과 rat은 26 아미노산, bovine은 27 아미노산)에 비하여 4~5 아미노산이 적은것으로

	-22	-1	
Brook t.	MGQVFLLLPVLLVSCFLSQGAAMENQRLEFNIAVNRVQHLHLLMAQKMFNDFEVTLLPDERF		60
Atlantic s.	MGQVFLLMPVLLVSCFLSQGAAMENQRLEFNIAVNRVQHLHLLMAQKMFNDFEGTLLPDERF		60
Coho s.	MGQVFLLMPVLLVSCFLSQGAAIENQRLEFNIAVSRVQHLHLLAQKMFNDFDGTLLPDERF		60
Chum s1.	MGQVFLLMPVLLVSCFLSQGAAIENQRLEFNIAVSRVQHLHLLAQKMFNDFDGTLLPDERF		60
Chum s2.	MGQVFLLMPVLLVSCFLSQGAAMENQRLEFNIAVNRVQHLHLLAQKMFNDFEGTLLPDERF		60
Rainbow t1.	MGQVFLLMPVLLVSCFLSQGAAIENQRLEFNIAVSRVQHLHLLAQKMFNDFEGTLLPDERF		60
Rainbow t2.	MGQVFLLMPVLLVSCFLSQGAAIENQRLEFNIAVNRVQHLHLLAQKMFNDFEGTLLPDERF		60
Tilapia	MNSVLLLSVCLG-VSSQIT-DSQRLEFIAVNRVTHLHLLAQRFSDFESSQTEEQF		58
Flounder	MNRVILLVSMCVG-VSSQIT-ENQRLEFIAGRVQYLHLVAKKLFSDFENSQLEDQF		58
Carp	MARVLVLLSVLVSLLVNQGRASDNQRLEFNNAVIRVQHLHLLAAKMINDFEDSLPEERF		60
Tuna	MDRVFLLSVLSLG-VSSQIT-DSQRLEFIAVSRVQHLHLLAQRFSDFESSQTEEQF		58
	C		
Brook t.	QLNKIFLLDFCNDSIVSPIDKHETQKSSVLKLLHISYRLIESWEYPSQTL	--T	118
Atlantic s.	QLNKIFLLDFCNDSIVSPIDKLETQKSSVLKLLHISFRLESWEYPSQTL	--T	118
Coho s.	QLNKIFLLDFCNDSIVSPVDKHETQKSSVLKLLHISFRLESWEYPSQTL	--I	118
Chum s1.	QLNKIFLLDFCNDSIVSPVDKHETQKSSVLKLLHISFRLESWEYPSQTL	--I	118
Chum s2.	QLNKIFLLDFCNDSIVSPIDKQETQKSSVLKLLHISFRLESWEYPSQTL	--T	118
Rainbow t1.	QLNKIFLLDFCNDSIVSPVDKHETQKSSVLKLLHISFRLESWEYPSQTL	--I	118
Rainbow t2.	QLNKIFLLDFCNDSIVSPIDKQETQKSSVLKLLHISFRLESWEYPSQTL	--I	118
Tilapia	QLNKIFLQDFCNSDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYGLVESWEFPRSLL	-----SGG	112
Flounder	LLNKIASKEFCHSDNFLSPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLESWEFPRSLL	-----VAS	112
Carp	QLSKIFPLSFCNSDYIEAPAGKDETKQSSMLKLLRISFHLIESWEFPRSLL	-----SGG	120
Tuna	QLNKIFLQDFCNDDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLESWEFPRSLL	-----SGG	112
Brook t.	VRNSNQISEKLSDLKVGINLLITGSDQDGVLSLDDNDSQQLPPYGNYYQNLGGDGNVRRNY		178
Atlantic s.	VRNSNQISEKLSDLKVGINLLIKGSDQDGVLSLDDNDSQQLPPYGNYYQNLGGDGNVRRNY		178
Coho s.	VGNANQISEKLSDLKVGINLLITGSDQDGLLSLDDNDSQQLPPYGNYYQNLGGDGNVRRNY		178
Chum s1.	VRNSNQISEKLSDLKVGINLLITGSDQDGVLSLDDNDSQQLPPYGNYYQNLGGDGNVRRNY		178
Chum s2.	VRNSNQISEKLSDLKVGINLLIEGSDQEGVLSLDDNDSQHLPPYGNYYQNLGGDGNVRRNY		178
Rainbow t1.	VRNSNQISEKLSDLKVGINLLITGSDQDGVLSLDDNDSQQLPPYGNYYQNLGGDGNVRRNY		178
Rainbow t2.	VRNSNQISEKLSDLKVGINLLIKGSDQDLALSLDDNDSQHLPPYGNYYQNLGGDGNVRRNY		178
Tilapia	SSLRNQISPRSELKTGILLIRANQDEAENYPTDTLQHAPYGNYYQSLGGNESLRQTY		172
Flounder	FAVRTQVTSKLSSELKMGLLKLEIANQDGGGFESESVLQLTPYGN	---S---E-L---F	161
Carp	VGNPNQLTEKLADLKMGISVLIQACLGDQPNMDDNDSLPLP	-FEDFYLTM-GENNLRSEF	178
Tuna	SAPRNQISPKLSELKTG		172
	C	C	C
Brook t.	ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKSLEANCTL		210
Atlantic s.	ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKSLEANCTL		210
Coho s.	ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKSLEANCTL		210
Chum s1.	ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKSLEANCTL		210
Chum s2.	ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKSLEANCTL		210
Rainbow t1.	ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKSLEANCTL		210
Rainbow t2.	ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKSLEANCTL		210
Tilapia	ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKSLEANCTL		204
Flounder	---ACFKKDMHKVETYLTVAKRFLPEANCTL		190
Carp	RLLACFKKDMHKVETYLTVANCRRLSDNCTL		210
Tuna	ELLACFKKDMHKVETYLTVAKRFLPEANCTL		204

Fig. 2. Alignment of the amino acid sequences coding growth hormone cDNA in fishes. Black boxes showed the conserved amino acids of growth hormone ORF in fishes.

Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) 성장호르몬 cDNA의 염기배열 결정

(Sense Primer) ATTAAGAG-TAAAAATG

1) Brook t. ATTAAGAG-TAAAAATG 16  
 2) Atlantic s. CAACCGACCACCGCACTTCAAGTTAAGTAATCATCCTTGGCAATTAAGAG-TAAAAATG 59  
 3) Coho s. TACATACTCAACCGACCACCGCACTTCAAGTTAAGTAATCATCCTTGGCAATTAAGAG-TAAAAATG 67  
 4) Chum s. GH1 TACATACTCAACCGACCACCGCACTTCAAGTTAAGTAATCATCCTTGGCAATTAAGAG-TAAAAATG 67  
 5) Chum s. GH2 ATACTGAACCGACCACCGCACTTCAAGTTAAGTAATCATCCTTGGCAATTAAGAG-AGAAGATG 64  
 6) Rainbow t. GH1 CCCATTTCAAGTTAAGTAATCATCCTTGGCAATTAAGAG-TAAAAATG 47  
 7) Rainbow t. GH2 GGTGATTAAGAGAAAAAATG 21

GGAC

\*\*\*\*\*  
 1) GGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCGATGAAAAACCAACGGCTCT 68  
 2) GGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCTGAGCCAAGGGGCAGCGATGAAAAACCAACGGCTCT 111  
 3) GGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCGATGAAAAACCAACGGCTCT 119  
 4) GGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCGATGAAAAACCAACGGCTCT 119  
 5) GGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCGATGAAAAACCAACGGCTCT 116  
 6) GGACAAGTGTTCCTGCTAATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCTGAGTCAAGGGGCAGCGATGAAAAACCAACGGCTCT 99  
 7) GGACAAGTGTTCCTGCTGATGCCAGTCTTACTGGTCAGTTGTTTCTGGTCAAGGGGCAGCGATGAAAAACCAACGGCTCT 73

\*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*  
 1) TCAACATCGCGGTCAACCGGGTGAACATCTCCACCTAATGGCTCAGAAAAATGTTCAATGACTTTGAAGTTACCTGTTGTC 128  
 2) TCAACATCGCGGTCAACCGGGTGAACATCTCCACCTAATGGCTCAGAAAAATGTTCAATGACTTTGAAGTTACCTGTTGTC 171  
 3) TCAACATCGCGGTCAACCGGGTGAACATCTCCACCTAATGGCTCAGAAAAATGTTCAATGACTTTGAAGTTACCTGTTGTC 179  
 4) TCAACATCGCGGTCAACCGGGTGAACATCTCCACCTAATGGCTCAGAAAAATGTTCAATGACTTTGAAGTTACCTGTTGTC 179  
 5) TCAACATCGCGGTCAACCGGGTGAACATCTCCACCTAATGGCTCAGAAAAATGTTCAACGACTTTGAAGTTACCTGTTGTC 176  
 6) TCAACATCGCGGTCAACCGGGTGAACATCTCCACCTAATGGCTCAGAAAAATGTTCAATGACTTTGAAGTTACCTGTTGTC 159  
 7) TCAACATCGCGGTCAACCGGGTGAACATCTCCACCTAATGGCTCAGAAAAATGTTCAACGACTTTGAAGTTACCTGTTGTC 133

\*\*\*\*\*  
 1) TGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCCTGCTGGACTTCTGTAACCTCCGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCAG 188  
 2) TGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCCTGCTGGACTTCTGTAACCTCCGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCAG 231  
 3) TGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCCTGCTGGACTTCTGTAACCTCCGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCAG 239  
 4) TGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCCTGCTGGACTTCTGTAACCTCCGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCAG 239  
 5) TGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCCTGCTGGACTTCTGTAACCTCCGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCAG 236  
 6) TGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCCTGCTGGACTTCTGTAACCTCCGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCAG 219  
 7) TGATGAACGCAGACAGCTGAACAAGATATTCCTGCTGGACTTCTGTAACCTCCGACTCCATCGTGAGCCCAATCGACAAGCAG 193

\*\*\*\*\*  
 1) GAGACTCAGAAGAGTTCAGTCTGAAAGCTGCTCCACATCTTACCCTGCTGATGAAATCCTGGGAGTACCCTAGCCAGACCT 308  
 2) GAGACTCAGAAGAGTTCAGTCTGAAAGCTGCTCCACATCTTACCCTGCTGATGAAATCCTGGGAGTACCCTAGCCAGACCT 351  
 3) GAGACTCAGAAGAGTTCAGTCTGAAAGCTGCTCCACATCTTACCCTGCTGATGAAATCCTGGGAGTACCCTAGCCAGACCT 359  
 4) GAGACTCAGAAGAGTTCAGTCTGAAAGCTGCTCCACATCTTACCCTGCTGATGAAATCCTGGGAGTACCCTAGCCAGACCT 359  
 5) GAGACTCAGAAGAGTTCAGTCTGAAAGCTGCTCCACATCTTACCCTGCTGATGAAATCCTGGGAGTACCCTAGCCAGACCT 356  
 6) GAGACTCAGAAGAGTTCAGTCTGAAAGCTGCTCCACATCTTACCCTGCTGATGAAATCCTGGGAGTACCCTAGCCAGACCT 339  
 7) GAGACTCAGAAGAGTTCAGTCTGAAAGCTGCTCCACATCTTACCCTGCTGATGAAATCCTGGGAGTACCCTAGCCAGACCT 313

\*\*\* \*\*\*\*\*  
 1) TGACCATCTCCAACAGCCTAATGGTCAGAACTCCAACAGATCTCTGAGAAGCTCAGCGACTCAAAGTGGGCATCAACCT 368  
 2) TGACCATCTCCAACAGCCTAATGGTCAGAACTCCAACAGATCTCTGAGAAGCTCAGCGACTCAAAGTGGGCATCAACCT 411  
 3) TGATCATCTCCAACAGCCTAATGGTCAGAACTCCAACAGATCTCTGAGAAGCTCAGCGACTCAAAGTGGGCATCAACCT 419  
 4) TGATCATCTCCAACAGCCTAATGGTCAGAACTCCAACAGATCTCTGAGAAGCTCAGCGACTCAAAGTGGGCATCAACCT 419  
 5) TGACCATCTCCAACAGCCTAATGGTCAGAACTCCAACAGATCTCTGAGAAGCTCAGCGACTCAAAGTGGGCATCAACCT 416  
 6) TGATCATCTCCAACAGCCTAATGGTCAGAACTCCAACAGATCTCTGAGAAGCTCAGCGACTCAAAGTGGGCATCAACCT 399  
 7) TGATCATCTCCAACAGCCTAATGGTCAGAACTCCAACAGATCTCTGAGAAGCTCAGCGACTCAAAGTGGGCATCAACCT 373

\*\*\*\*\*  
 1) GCTCATCAGGGGAGCCAGGATGGCCTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGCTGCCCCCTACGGGAAGTACTACT 488  
 2) GCTCATCAGGGGAGCCAGGATGGCCTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGCTGCCCCCTACGGGAAGTACTACT 531  
 3) GCTCATCAGGGGAGCCAGGATGGCCTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGCTGCCCCCTACGGGAAGTACTACT 539  
 4) GCTCATCAGGGGAGCCAGGATGGCCTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGCTGCCCCCTACGGGAAGTACTACT 539  
 5) GCTCATCAGGGGAGCCAGGATGGCCTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGCTGCCCCCTACGGGAAGTACTACT 536  
 6) GCTCATCAGGGGAGCCAGGATGGCCTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGCTGCCCCCTACGGGAAGTACTACT 519  
 7) GCTCATCAGGGGAGCCAGGATGGCCTACTGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCAGCTGCCCCCTACGGGAAGTACTACT 493

\*\*\*\*\*  
 1) CAGAACCTGGGGGGCGACGGAAACGTCAGGAGGAACACGAGTTGTTGGCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTCGAGA 548  
 2) CAGAACCTGGGGGGCGACGGCAACGTCAGGAGGAACATGAGTTGTTGGCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTCGAGA 591  
 3) CAGAACCTGGGGGGCGACGGAAACGTCAGGAGGAACACGAGTTGTTGGCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTCGAGA 599  
 4) CAGAACCTGGGGGGCGACGGAAACGTCAGGAGGAACACGAGTTGTTGGCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTCGAGA 599  
 5) CAGAACCTGGGGGGCGACGGCAACGTCAGGAGGAACACGAGTTGTTGGCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTCGAGA 596  
 6) CAGAACCTGGGGGGCGACGGAAACGTCAGGAGGAACACGAGTTGTTGGCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTCGAGA 579  
 7) CAGAACCTGGGGGGCGACGGCAACGTCAGGAGGAACACGAGTTGTTGGCTGCTTCAAGAAGGACATGCACAAGGTCGAGA 553

Fig. 3. Alignment of the nucleotide sequences for growth hormone cDNA in salmonids. Black boxes showed start codon and stop codon. Polyadenylation signal AATAAA is underlined at bottom line. Asterisks are showing the homology region.

→ 3' untranslated region

```

*****
1) CCTACCTGACCGTTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGGAGGCCAACTGCACCTCTGTAGACGTGGGCTGGAGAGGCAGCCAGCAA 608
2) CCTACCTGACCGTTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGGAGGCCAACTGCACCTCTGTAGACGTGGGCTGGAGAGGCAGCCAGCAA 651
3) CCTACCTGACCGTTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGGAGGCCAACTGCACCTCTGTAGACGTGGGCTGGAGAGGCAGCCAGCAA 659
4) CCTACCTGACCGTTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGGAGGCCAACTGCACCTCTGTAGACGTGGGCTGGAGAGGCAGCCAGCAA 659
5) CCTACCTGACCGTTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGGAGGCCAACTGCACCTCTGTAAACGTGGCCGAGCGGCAGCCAGCAA 656
6) CCTACCTGACCGTTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGGAGGCCAACTGCACCTCTGTAGACGTGGGCTGGAGAGGCAGCCAGCAA 639
7) CCTACCTGACCGTTCGCCAAGTGCAGGAAGTCACTGGAGGCCAACTGCACCTCTGTAAACGTGGGCGGAGCGGCAGCCAGCAA 613

*****
1) GAGCCTGTCTCCAGGGTTCGGTTTCCCAGATACAGATTAGGCCTTGCCTTGCACCTGAAGAGCATTTCATTTGAGATTCTCC 728
2) GAGCCTGTCTCCAGGGTTCGGTTTCCCAGATACAGATTAGGCCTTGCCTTGCACCTGAAGAGCATTTCATTTGAGATTCTCC 771
3) GAGCCTGTCTCCAGGGTTCGGTTTCCCAGATACAGATTAGGCCTTGCCTTGCACCTGAAGAGCATTTCATTTGAGATTCTCC 779
4) GTGCCTGTCTCCAGGGTTCGGTTTCCCAGATACAGATTAGGCCTTGCCTTGCACCTGAAGAGCATTTCATTTGAGATTCTCC 779
5) GAGCCTGTCTCCAGGGTTCGGTTTCCCAGATACAGATTAGGCCTTGCCTTGCACCTGAAGAGCATTTCATTTGAGATTCTCC 771
6) GAGCCTGTCTCCAGGGTTCGGTTTCCCAGATACAGATTAGGCCTTGCCTTGCACCTGAAGAGCATTTCATTTGAGATTCTCC 759
7) GAGCCTGTCTCCAGGGTTCGGTTTCCCAGATACAGATTAGGCCTTGCCTTGCACCTGAAGAGCATTTCATTTGAGATTCTCC 733

*****
1) TTGAACATG--CTTTTAGTCTAGAGTAGATTTATTTTCTATCTAGTAGAGCCTGACT-----ACAGGCATTTT-C 786
2) ATTGAACATG--CTTTTAGTCTAGAGTAGATTTATTTTGGATCTGGTAGAGCCTGACTCCAGGGGTTTTTCAGGAATTT-GC 829
3) ATTGAACATG--CTTTTCAGTCTAGAGTAATTTTCAATTTTGGATCTGGTAGAGCCTGACTCCAGGGGTTTTTCAGGCATTTGCA 837
4) ATTGAACATG--CTTTTCAGTCTGGAGTAATTTAATTTTGGATCTGGTAGAGCCTGACTCCAGGGGTTTTTCAGGCATTTGCA 837
5) ATTAGGCATG--CTTTTTCAGTCTAGAGTAGATTTTATTTTGGATCTGGTAGAGCCTGGCTCCAGGGGTTTTTCAGGCATTTGCA 830
6) ATTGAACATG--CTTTTTCAGTCTAGAGTAATTTTATTTTGGATCTAGTAGAGCCTGACTCCAGGGGTTTTTCAGGCATTT-GC 817
7) ATTGGCATGTTTTTTTAGTCTAGAGTAGATTTTATTTTGGATCTGGTAGAGCCTGGCTCCAGGGGTTTTTCAGGCATTTGCA 793

*****
1) ATTTTGTCTCTGAATCAACAACAGCAGCATTCTA---TATTGAATCTATTACTCTGAGCTACCATTGATTAGTACATTTAT 835
2) ATTTTGTCTCTGAATCAACAACAGCAGCATTCTA---TATTGATCT---ATTACTCTGAGCTACCATTGAT----- 888
3) CTTTTTGTCTGAATCAACAACAGCAGCATTCTA---TATTGATCTATTACTCTGAGCTACCATTG----- 897
4) -TTTTTGTCTCTG-----AA-----TCACCTCTGAGCTACCATTG----- 896
5) ATTTTGTCTCTGAATCAACAACAGCAGCATTCTA---GATTTTCACTCCATTACTCGGAGCTCAAGCTGATCC---ATGGAC 890
6) CTTTTTGTCTCTG---AATCAACAACAGCAGCATTCTA---TATTGATCTATTACTCTGAGCTACCATTG----- 876
7) ATTTTGTCTCTG-----AA-TCACTTCTATGATTTTCACTCCATTACTCGGAGCTACCATTGATCC---ATGGAC 853

*****
1) AGAAAAGGTTATTAATGCTCTATTTAGATATATGATTCATGGTGGTCTACTGTTTATGCATACATTAATATTTAGGGGGT 952
2) -----TAGTACA-----TTTATAGAAAAGGTTATTAATA---T-GTCTTATTAGATATATGATTC---ATGGTGGTG 972
3) -----ATTAGTACA-----TTTATAGAAAAGGTTATTAATATG-T-CT--TATTAGATATATGTT---TCATGGCGGTG 985
4) -----ATTAGTACA-----TTTATAGAAAAGGTTATTAATAATGCTACTGTTTATGCATACGTTAATATTTAGGGGGT 954
5) ATTTTAGATTAGTACA-----TTTATAGAAAAGGTTATTAATAATG-TCTTATTAGATATATGATTCAGGTTGGTGGTG 990
6) -----ATTAGTACA-----TTTACAGAAAAGGTTATTAATATG---CTTATTAGATATATGTTTCAATG---CGGTG 963
7) ATTTTAGATTAGTACA-----TTTATTGAAAAGGTTATTAATAATG---CTTATTAGATATATGATTCAGGTTGGTGGTG 951

*****
1) AAATGGGAACCTGTAGAGCTCCAAGCTTTTGGAT--AATA---TATTTTAGAGTAATTTCCCTTAAAGTATTTTC----- 1012
2) CTA-CTGTTTATGCATACATTCATATTTAGGGGTGAAATGGGAACGTGTAGAGCTCCAAGCTTTT--GGATAA----- 1028
3) CTA-CTGTTTATGCATACGTTAATATTTAGGGGTGAAATGGGAACCTGTAGAGCTCCAAGCTTTT--GGATAA----- 1039
4) AAATGGGAACCTGTAGAGCTCCAAGCTTTTGGAT--AAT---ATATTTTAGAGTAATTTCCCTTTTAGTATTTTC----- 1014
5) CCAT---TTATGTATACATTAATATTTAGGGGTGAAATGGGAACGTGTAGAGCTCCAAGCTTTT--TTAGGATATGTC----- 1046
6) CTA-CTGTTTATGCATACGTTAATATTTAGGGGTGAAATGGGAACCTGTAGAGCTCCAAGCTTTT--GGATAA----- 1019
7) ---GCCATTTATGCATAAATTAATATTTAGAGGTGAAATGGGAACATGTAGAGCTCCAATCTTTTAGTACGTCACAGATGG 1007

*****
1) -----ATTC-CTTAATCATATTGTTTGAACATAACTGATT-----CGTTTT-----TTTT 1067
2) -----ATA-TTTTAGAGTATTTCCCTTTAAGT-ATTTTCATTTCTTAATCTTATTGTTTGAACATAAGTGTATACATTTT 1056
3) -----ATA-TTTTAGAGTAAATTTCCCTTTAAGT-ATTTTCATTTCTTAATCTTATTGTTTGAACATAAAGTGTATCATGTT 1084
4) -----ATTC-CTTAATCTTATTGTTTGAACATAAGTGTATTCATGTTTCAATAAAGATGTTCTTCTCTGA 1056
5) -----A-----CAGATGGATAATATAAATAA-ATTTTCATTTCTTATCTTACTGTTTGAACCGAATAGTGTATTGT-TTT 1093
6) -----ATA-TTTTAGAGTAAATTTCCCTTTAAGT-ATTTTCATTTCTTAACTTAACTTATTGTTTGAACATAAAGTGTATCATGTT 1064
7) ATAATATA-TTTTAGAGTATTTCCCT-TGAAGTATTTTCATTTCTTATCTTACTGTTTGAACCGAATAGTGTATTCGT-TTT 1067

CAATAAAG----CTTCTCTGCGGT(Anti-sense Primer)
*****
1) CAATAAAG----CTTCTCTGCGGT 1120
2) CAATAAAGCTGTGTTCTCTGCG 1169
3) CAATAAAGATGTTCTCTCTGCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1201
4) 1120
5) CAATAA-----CTTCTCTGCGGT 1180
6) CAATAAAGATCTTCTCTCTGCG 1161
7) CAATAA-----CTTCTCTGCGGT 1159

```

Fig. 3. Continued.

나타났다. 이와같이 성숙 호르몬을 분비하면서 분리되는 이들 signal peptides는 어류와 포유동물에서 낮은 아미노산 상동성을 나타냈다(Fig. 2).

또한 brook trout 성장호르몬 cDNA에는 1,103~1,107 bp에 위치한 polyadenylation signal(AATAAA)과 당단백질의 당결합 부위(arginine-linked glycosylation site)인 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr가 2곳(153 aa와 207 aa) 존재하였다(Fig. 1). 당결합부위는 연어과 어종과 carp의 경우 2곳이 모두 같은 위치에 존재하고 있는 반면에 tilapia와 flounder의 경우 한곳만이 같은 위치에 존재하고 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 그리고 단백질의 고차구조를 형성하는 cysteine 잔기가 4곳 존재하였으며, 이 아미노산의 위치는 어류 및 고등동물에 있어서 모두 같은 곳에 위치하고 있는 것으로부터 성장호르몬 단백질의 고차구조는 어류 및 고등동물에 있어 유사한 구조를 하고 있는 것으로 추측되었다.

*Salvelinus*屬에 속하는 brook trout 성장호르몬의 아미노산은 연어과 어류중에서도 *Salmo*屬에 속하는 Atlantic salmon과 97.1%, *Oncorhynchus*屬에 속하는 chum salmon과 94.8%, rainbow trout와 94.3%, coho salmon과 91.9%의 아미노산 상동성을 나타낸 것으로부터 같은 *Oncorhynchus*屬에 속하는 어종의 아미노산 상동성이 약 92~97%인 반면에 *Salvelinus*屬에 속하는 brook trout는 屬이 다른 Atlantic salmon과 97%의 높은 아미노산 상동성을 나타내고 있는 것으로 부터 *Salvelinus*屬과 *Salmo*屬의 성장호르몬은 같은 연어과 어류 중에서도 매우 유사할 것으로 추측되었다. 그리고 다른 어종과의 아미노산 상동성을 비교한 결과 tuna와 66.2%, tilapia와 63.5%, yellow tail과 62.9%, carp와 62.3%, flounder와 53.8%, eel과 48.1% 그리고 인간을 포함한 고등동물과는 약 38~41%의 아미노산 상동성을 나타냈다.

### 3. 계통수

Brook trout 성장호르몬 cDNA의 아미노산 배열과 이미 보고된 어류의 성장호르몬 cDNA의

아미노산 배열을 자료로 UPGMA법을 이용하여 계통수를 작성하였다. Fig. 4에 나타난 것 처럼 연어과 어류는 타 어종과 전체적으로 유전적 거리가 먼 군을 형성하고 있었으며, brook trout의 성장호르몬은 Atlantic salmon의 성장호르몬과 유전적 거리가 가까운 것을 알 수 있었다. 그리고 연어과에서 이미 보고된 2가지 유형의 성장호르몬 cDNA와 비교한 결과 brook trout의 성장호르몬은 GH2에 더 근접하다는 것이 시사되었다. 본 연구에서 보고하고 있는 brook trout 성장호르몬 cDNA의 분자적 구조는 지금까지 연어과 어종 중 *Oncorhynchus*屬과 *Salmo*屬의 성장호르몬 cDNA가 보고 되었지만 *Salvelinus*屬에서는 처음 발표되는 것으로 어류에 있어 種間·屬間의 성장호르몬 아미노산의 변환을 검토할 수 있는 분자

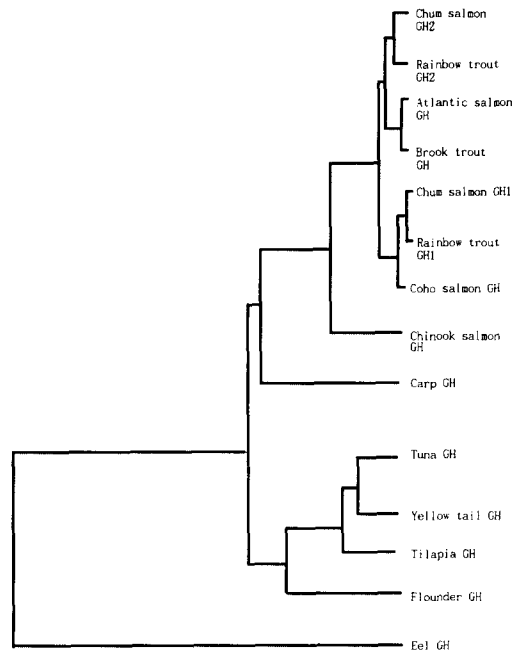


Fig. 4. Phylogenetic tree showing the genetic relationships of fishes using growth hormone (GH) cDNA. The tree is based on overall similarity of growth hormone amino acid sequences by UPGMA.

생물학적 자료이다. 또한 brook trout 성장호르몬이 Atlantic salmon과 97%의 매우 높은 아미노산 상동성을 나타내고 있는 것으로 부터 *Salverinus*屬과 *Salmo*屬의 성장호르몬은 연어과 어종의 초기 진화의 분기점이 *Oncorhynchus*屬 보다는 유사한 시점에서 분화가 진행된 것으로 추측되었다. 그리고 연어과 어종의 성장호르몬을 비교함으로써 brook trout에도 다른 유형의 성장호르몬 cDNA가 존재할 것으로 사료되었으며, 또한 본 연구를 통하여 확보된 성장호르몬 cDNA를 이용한 단백질 생산 및 transgenic fish를 생산하는데 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 PCR을 이용하여 brook trout의 성장호르몬 cDNA를 증폭시켰다. 증폭된 brook trout의 성장호르몬 cDNA의 전 염기서열은 1,120 bp로 13 bp의 5' uncoding region과 477 bp의 3' uncoding region 그리고 630bp로 coding되는 210 아미노산 잔기가 open reading frame(ORF)을 구성하고 있음을 알았다. 또한, ORF의 아미노산 배열로부터 22개의 아미노산으로 이루어진 signal peptide 그리고 4개의 cysteine 잔기로 부터 2개의 disulfide bond 결합을 하고 있었으며, 이는 성장호르몬 단백질이 種을 초월하여 2개의 disulfide bond 결합으로 이루어진 고차구조를 형성하고 있는 것이 시사되었다. 그리고 Atlantic salmon과 97.1%, chum salmon과 94.8%, rainbow trout와 94.3%, coho salmon과 91.9%, tuna와 66.2%, tilapia와 63.5%, yellow tail과 62.9%, carp와 62.3%, flounder와 53.8%, eel과 48.1%의 아미노산 상동성을 나타냈다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단의 1996년도

Post-Doc. 지원사업에 의한 연구비로 수행된 결과로 상기재단에 감사드립니다. Brook trout의 뇌하수체 조직을 제공해주신 동경수산대학의 유전생화학과의 Aoki 교수님께 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Agellon, L. B. and T.T. Chen, 1986. Rainbow trout growth hormone : Molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. DNA, 5 : 463-471.
- Agellon, L. B. and T. T. Chen, 1988. Rainbow trout has two genes for growth hormone. Mol. Reprod. Dev. 1, 11-17. GH1 and GH2
- Allendorf, Y. W. and G. H. Thorgaard, 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. In : The Evolutionary Genetics of Fishes. B. J. Turner, ed.(Plenum Press, New York) pp. 1-53.
- Bolton, J. P., N. L. Collie, H. Kawauchi and T. Hirano, 1987. Osmoregulatory actions growth hormone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Endocrinol., 112 : 63-68.
- Devlin, R. H., 1993. Sequence of salmon type I and 2 growth hormone genes and the relationship of rainbow trout with Atlantic salmon and Pacific salmon. Can. J. Fisher. Aquat. Sci., 50 : 1738-1748.
- Donaldson, E. M., U. H. M. Fagerlund, D. A. Higgs and J. R. McBride, 1979. Hormonal enhancement of growth. In Fish Physiology. W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brett, eds. (Academic, New York) vol. 8, pp. 455-597.
- Gonzalez-Villasenor, L. I., P. Zhang, T. T. Chen and D. A. Powers, 1988. Molecular cloning and sequencing of coho salmon growth hormone cDNA. Gene, 65 : 239-246.
- Johansen, B., O. C. Johnsen, and S. Valla, 1989. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). Gene, 77 : 317-324.
- Kawauchi, H., S. Horiyama, A. Yasuda, K. Yamaguchi, K. Shirahata, J. Kubota and T. Hirano, 1986. Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. Arch. Biochem. Biophys., 244 : 542-552.



- Koren, Y., S. Sarid, R. Ber and V. Daniel, 1989. Carp growth hormone : molecular cloning and sequencing of cDNA. *Gene*, 77 : 309-315.
- Madsen, S. S., 1990. The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta*). *Gen. Comp. Endocr.* 79, 1-11.
- Mckewon, B. A., J. F. Leatherland and T. M. John, 1975. The effect of growth hormone and prolactin on the mobilization of free fatty acids and glucose in the kokanee salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50B : 425-430.
- Rentier-Delrue, F., D. Swennen, L. Mercier, M. Lion, O. Benrubi and J. A. Martial, 1989a. Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA : Expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. *DNA* 8, 109-117. GH1 and GH2
- Rentier-Delrue, F., D. Swennen, J. C. Philippart, C. L'Hoir, M. Lion, O. Benrubi and J. A. Martial, 1989b. Tilapia growth hormone : Molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA*, 8 : 271-278.
- Saito, A., S. Sekine, Y. Komatsu, M. Sato, T. Hirano and S. Itoh, 1988. Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 73, 545-551.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- Sato, N., K. Watanabe, K. Murata, M. Sakaguchi, Y. Kariya, S. Kimura, M. Nonaka and A. Kimura, 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 949 (1), 35-42.
- Sekine, S., T. Mizukami, T. Nishi, Y. Kuwana, A. Saito, M. Sato, S. Itoh and H. Kawachi, 1985. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 : 4306-4310.
- Sekine, S., T. Mizukami, A. Saito, H. Kawachi and S. Itoh, 1989. Isolation and characterization of a novel growth hormone cDNA from chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1009 : 117-120.
- Shao, J. D., R. H. Devlin and C. L. Hew, 1993. Genomic structure of growth hormone genes in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) : Presence of two functional genes, GH-I and GH-II, and a male-specific pseudogene, GH-ψ. *DNA and Cell Biology*, 12 : 739-751.
- Song, S., K. T. Trinh and C. L. Hew, 1992. Cloning and sequence analysis of salmon growth hormone cDNA. I Chuan Hsueh Pao, 19(4) : 308-315.
- Watahiki, M., M. Tanaka, N. Masuda, M. Yamakawa, Y. Yoneda and K. Nakashima, 1988. cDNA cloning and primary structure of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) pre-growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 70 : 401-406.
- Watahiki, M., M. Yamamoto, M. Yamakawa, M. Tanaka and K. Nakashima, 1989. Conserved and unique amino acid residues in the domains of the growth hormones : Flounder growth hormone deduced from the cDNA sequence has the minimal size in the growth hormone prolactin gene family. *J. Biol. Chem.*, 264 : 312-316.
- Young, G., B. T. Bjornsson, P. Prunet, R. J. Lin and H. A. Bern, 1989. Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) : Plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormone, and cortisol. *Gen. Comp. Endocr.*, 74 : 335-345.